

10/522161

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

**BEST AVAILABLE COPY**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**

**R1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 W / 300301

Réservé à l'INPI

**REMISE DES PIÈCES**

DATE **25 JUIL 2002**  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0209456**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI  
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE **25 JUIL. 2002**  
PAR L'INPI

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
**À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

CABINET LAVOIX  
2, Place d'Estienne d'Orves  
75441 PARIS CEDEX 09

**Vos références pour ce dossier**

(facultatif) BFF 02/0290

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

*Demande de brevet initiale*

N°

Date

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

Procédé de fabrication de puces biologiques

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**  
**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE**  
**LA DATE DE DÉPÔT D'UNE**  
**DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

**5 DEMANDEUR**

☒ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

3, rue Michel Ange

Code postal et ville

75016 PARIS

Pays

FRANCE

Française

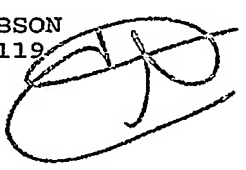

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>25 JUIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0209456</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	CB 540 W / 300301
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		<b>BFF 02/0290</b>	
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		CABINET LAVOIX 2 Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09 01 53 20 14 20 01 48 74 54 56 brevets@cabinet-lavoix.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> C. JACOBSON n° 92.1119 	
			

L'invention concerne un procédé d'immobilisation d'ADN, de protéines ou d'oligo ou polysaccharides sur un support solide pour la fabrication de puces biologiques, et les puces obtenues par ce procédé.

5            Différents procédés sont aujourd'hui utilisés pour la fabrication de puces à ADN. Selon une première méthode, des oligonucléotides sont synthétisés directement sur le support après ancrage covalent d'un précurseur (système Affymetrix, Niemeyer et Blohm Angew ; Chem. Int. Ed. 1999, 38, 2865-2869), ce qui conduit à des puces de coût élevé. Le  
10        fournisseur ne fournit en outre pas tous les détails sur les séquences des oligonucléotides immobilisés.

             Selon une deuxième approche, les oligonucléotides sont présynthétisés, biotinylés et déposés ensuite sur une plaque activée par une couche de streptavidine. L'accrochage se fait via des  
15        interactions spécifiques non covalentes biotine-streptavidine, cette dernière étant une protéine ayant l'inconvénient d'être de stabilité modérée. Lorsque les puces sont constituées de fragments d'ADNc, ceux-ci sont le plus souvent immobilisés par adsorption sur une couche d'aminosilane ou de polylysine. Cette dernière stratégie pose souvent  
20        des problèmes de répétabilité et d'homogénéité de surface liés à la difficulté de contrôler la qualité du film de polylysine et sa stabilité.

             Selon une troisième voie, les oligonucléotides ou ADNc sont ancrés sur le support grâce à un couplage covalent, via un lien chimique organique. Cela nécessite (a) la fonctionnalisation de la  
25        surface par des chaînes à terminaisons réactives, par exemple des fonctions acide carboxylique activées, (b) la modification des oligonucléotides ou ADNc en position 5' par une fonction, par exemple une amine primaire, susceptible de réagir avec les terminaisons mentionnées ci-dessus. Il s'agit de produits "clés en main" d'un coût  
30        relativement élevé, imposant l'achat des oligonucléotides convenablement modifiés. Ces approches sont décrites notamment dans la demande de brevet WO 01/42 495.

La technologie des puces à ADN est également discutée dans l'article de revue de Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(16):3011-3016.

Parallèlement, ont été développées des puces sur lesquelles  
5 des polymères biologiques autres que de l'ADN étaient immobilisés, par exemple des protéines ou peptides.

Cette technologie a été mise au point principalement par adaptation de la technologie des puces à ADN (cf par exemple la demande WO 93/22 680 d'Affymax).

10 Une approche de fixation de protéines par liaison covalente est par exemple rapportée dans Mac Beath et Schreiber, *Science*, 2000, 289:1760-1763, Mitchell, *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 225-229 et « Protein microarray technology », dans *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(4), 160-166.

15

Les auteurs de la présente invention ont maintenant mis au point un nouveau procédé de fabrication de produits de type puces biologiques, qui présente en outre des avantages vis-à-vis des techniques existantes.

20 Il s'agit d'immobiliser des polymères biologiques, tels qu'ADN, protéines, oligo ou polysaccharides, porteurs d'un groupement phosphate ( $\text{OP(O)(OH)}_2$ ) ou phosphonate ( $\text{P(O)(OH)}_2$ ) libre, sur un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec lesdits groupements phosphate ou  
25 phosphonate. Ces groupements qui servent de fonctions d'ancrage peuvent être présents naturellement dans le polymère ou introduits par modification enzymatique ou chimique.

L'ancrage s'effectue alors par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate libre du polymère et le métal.

30 Ce mode d'ancrage, du type iono-covalent, est plus résistant que les systèmes mettant en jeu des interactions du type liaison

hydrogène ou du type électrostatique (comme c'est le cas avec la polylysine par exemple).

La présente invention a donc pour objet une méthode de fabrication d'un produit de type puce biologique comprenant  
5 l'immobilisation d'au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre sur un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, ledit polymère biologique étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-  
10 covalente entre le groupement phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.

Un autre objet de l'invention est un produit obtenu par ce procédé, à savoir un produit de type puce biologique, comprenant un support solide plan présentant une surface recouverte d'un métal  
15 capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente.

Un kit de préparation d'un produit tel que défini précédemment  
20 fait également partie de l'invention. Ce kit comprend les éléments suivants :

- un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate ;
- 25 - au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre ;
- éventuellement des réactifs. Une solution d'acide phosphonique peut par exemple être utile dans l'hypothèse où on désirerait saturer les sites de coordination sur les zones non ciblées. Une solution  
30 d'acide phosphonique 1 mM (exemple :  $C_4H_9PO_3H_2$ ) peut notamment être utilisée.

L'invention vise par ailleurs l'utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini ci-dessus, à des fins de criblage de composés susceptibles de se lier audit polymère biologique immobilisé, ou comme outil de diagnostic *in vitro*.

5

### ***Préparation du polymère biologique***

Par "polymère biologique", on entend un composé à base d'unités monomériques reliées entre elles, qui présente une activité biologique ou réagit avec un composé ayant une activité biologique.

On peut citer notamment les acides nucléiques, tels que ARN ou ADN, en particulier de l'ADNc ou des oligonucléotides ; des peptides, protéines, oligo ou polysaccharides. Des monomères synthétiques, qui n'existent pas de manière naturelle, peuvent éventuellement être utilisés pour construire un polymère biologique. Dans cette optique, peuvent par exemple être utilisés des carbamates, phosphonates, sulfonamides, et sulfoxides.

Comme autres exemples de polymère biologique, on peut également citer les PNA ("peptide nucleic acid") et les aptamers.

De manière générale, on peut immobiliser des oligonucléotides, oligoribonucléotides ou peptides que l'on peut former par des techniques combinatoires et qui sont doués de propriétés de reconnaissance vis-à-vis de molécules d'intérêt à détecter.

De manière avantageuse, on peut préparer ou obtenir des polymères biologiques qui présentent un groupement espaceur entre le groupement phosphate et le corps du polymère. Dans le cas où le polymère est un acide nucléique, on peut utiliser notamment des espaceurs du type polyA, polyC, polyT ou polyG (par exemple d'environ 10 mer), dont l'introduction via un synthétiseur est peu onéreuse.

De manière préférentielle, le polymère biologique est un acide nucléique, par exemple de l'ADN phosphorylé en position 5'.

Cette phosphorylation peut être réalisée facilement au moyen d'enzymes de type kinases, par exemple la T4 polynucléotide kinase en présence d'ATP, classiquement utilisée dans les réactions de PCR.

Le polymère biologique peut également être un acide nucléique, par exemple de l'ADN, phosphorylé en position 3'. Cette phosphorylation peut être réalisée chimiquement par des techniques standards, relatives à la chimie des phosphoramidites.

Le polymère biologique peut également être fonctionnalisé par une chaîne à terminaison acide phosphonique (par exemple un groupement  $-(CH_2)_6-PO_3H_2$ ), au moyen d'un couplage chimique. Dans ce cas, on peut utiliser par exemple un acide halogénoalkyl-phosphonique pour les oligonucléotides ou les saccharides ou un acide aminoalkylphosphonique pour les peptides.

Les acides nucléiques utilisés sont de préférence constitués de 25 à 70 mer (c'est-à-dire paires de bases), de préférence 40 – 50 mer, pour les oligonucléotides et de 100 à 2000 paires de bases pour les ADNc.

Selon un autre mode de réalisation, le polymère biologique est une protéine, un oligo ou polysaccharide ou un peptide fonctionnalisé ou modifié par un groupement phosphate ou phosphonate. Cette modification peut être réalisée par des méthodes chimiques ou enzymatiques, sauf bien sûr dans le cas où des groupements phosphate ou phosphonate libres sont présents naturellement, comme c'est le cas pour des peptides, protéines, voire même des oligo- ou polysaccharides déjà phosphorylés.

### ***Préparation du support***

Le support solide plan choisi peut être de n'importe quelle matière appropriée pour la fabrication de produits de type puces selon l'invention. On peut utiliser notamment un support en verre, en silicium, en mica, en quartz, en plastique, ou à base de divers polymères synthétiques. Le support peut être en outre recouvert d'une fine couche



d'or. Les supports en verre sont préférés, et on peut utiliser par exemple une lame de microscope, plus généralement toute plaque ou lame de verre, de quartz ou de silicium. La forme du support n'a pas d'importance.

5 Conformément à l'invention, le support présente une surface recouverte d'un métal. Ce métal est choisi de manière à être capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate. Le zirconium est particulièrement adapté, mais on peut citer également, à titre d'exemples, d'autres métaux tétravalents comme  
10 le titane, le vanadium, l'étain ; des métaux trivalents comme l'aluminium, le fer, le chrome, le gallium ; toute une série de métaux divalents comme le zinc, le manganèse, le cuivre, le cobalt, le nickel ; quelques cas de métaux hexavalents comme le molybdène, l'uranium, le tungstène. Une revue récente sur les métallophosphonates récapitule  
15 ces possibilités (A. Clearfield in *Progress in Inorganic Chemistry*, Vol. 47, (Ed.: K. D. Karlin), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998, pp. 371-510).

De préférence, ce métal est déposé sur la surface du support sous la forme d'une monocouche.

20 Il peut notamment être lié à la surface du support par l'intermédiaire d'une molécule ou bras espaceur. Il peut s'agir par exemple d'une chaîne d'acide gras portant un groupement phosphonate (par exemple, l'acide octadécylphosphonique), auquel se lie le métal par liaison iono-covalente.

25 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la molécule espaceur est l'acide octadécylphosphonique et le métal est le zirconium.

De manière avantageuse, on utilise des lames de verre sur lesquelles repose un film de type Langmuir-Blodgett à base de  
30 phosphonate de zirconium, préparées par le procédé tel que décrit dans Benitez et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124:4363-4370, par

immersion dans différentes solutions aqueuses. Dans ce cas, le film est lié au support de verre via des interactions hydrophobe-hydrophobe.

Ce procédé met en œuvre de l'acide octadécylphosphonique qui est une molécule amphiphile qui, une fois déposée à la surface d'une phase aqueuse, oriente sa tête polaire  $\text{PO}_3\text{H}_2$ , côté eau et sa chaîne carbonée côté air. En comprimant ces molécules, on peut alors former une monocouche de Langmuir-Blodgett qui peut être transférée sur une lame de verre ayant subi un traitement pour la rendre hydrophobe (par exemple, un traitement avec l'octadécylchlorosilane).  
 5 A ce stade, la lame est devenue hydrophile puisque ce sont les groupes acide phosphonique qui sont présents à la surface. Ceux-ci ont une forte affinité pour les ions métalliques tels que le zirconium pour former des liaisons iono-covalentes métal- $\text{PO}_3$ .  
 10

On obtient ainsi une surface à caractère métallique, constituée d'atomes de zirconium arrangés de manière régulière, la couche Langmuir-Blodgett mesurant alors 2,4 nm d'épaisseur.  
 15

Les supports mis en œuvre conformément à l'invention ont l'avantage d'être stables au cours du temps, et ne nécessitent pas de pré-activation nécessaire. Ils peuvent par ailleurs être stockés simplement dans l'eau.  
 20

Le film de phosphonate de zirconium peut également être fixé de façon covalente au support, en procédant comme décrit dans Katz et al., Chem. Mater., 1991, 3:699-703. Une première possibilité est de fonctionnaliser la surface de verre par le 3-aminopropyltriméthoxysilane qui vient se greffer sur la surface, et les fonctions  $\text{NH}_2$  terminales sont ensuite traitées par  $\text{POCl}_3$  et une base, pour introduire en bout de chaîne les groupes  $\text{PO}_3\text{H}_2$  qui sont prêts à recevoir la couche de zirconium. Une autre possibilité est de prendre des lames de mica ou de silicium recouvertes d'une couche d'or, et de les traiter avec l'acide  
 25 8-mercaptooctylphosphonique ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_8-\text{PO}_3\text{H}_2$ ) qui se greffe via un couplage thiol / or.  
 30

Des lames de borosilicate revêtues d'une fine couche d'or peuvent également être fonctionnalisées par des terminaisons  $\text{PO}_3\text{H}_2$  selon Brochsztain et al, J. Mater. Chem., 2002, 12:1250-1255, par traitement successivement avec du 2-mercaptoéthanol ( $\text{HS-C}_2\text{H}_5\text{-OH}$ ) et une solution ( $\text{POCl}_3$  + collidine).

### ***Immobilisation des polymères biologiques***

Les polymères biologiques peuvent être déposés sur le support par simple "spotting". De manière usuelle, il s'agit d'une opération de dépôt de microgouttes (par exemple environ 50 picolitres) ou « spots », au moyen d'un robot effectuant des prélèvements dans les puits de plaques de microtitration, par exemple.

Les polymères se fixent par liaison de coordination, de type iono-covalente, avec le métal à la surface du support.

Les spots sont de préférence arrangés sous la forme d'un réseau (ou "array") organisé. Tel qu'utilisé ici, le terme réseau ou "array" est un arrangement ordonné de spots de polymères biologiques, comme dans une matrice de lignes ou de colonnes. Typiquement, pour des spots d'environ 150 microns de diamètre et espacés de 300 microns, la densité de spots est de l'ordre de 500 par  $\text{cm}^2$ . De préférence, le réseau contient plus d'un polymère biologique immobilisé.

Dans le contexte de la présente invention, le terme "produit ou dispositif de type puce biologique" doit être compris comme incluant tout support solide sur lequel au moins un polymère biologique est immobilisé.

Du fait de l'orientation des polymères biologiques substantiellement perpendiculaire au support, on peut éventuellement immobiliser ces polymères à une haute densité, notamment jusqu'à une densité de  $10^{10}$ - $10^{12}$  polymères par  $\text{cm}^2$ .

Un objet particulier de l'invention est un produit de type puce biologique, comprenant une lame de verre présentant une surface recouverte d'une monocouche d'octadécylphosphonate de zirconium, au moins un acide nucléique portant un groupement phosphate en 5' étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre ledit groupement phosphate de l'acide nucléique et le zirconium.

### ***Utilisation des produits fabriqués***

Les produits de type puce biologique fabriqués conformément à l'invention trouvent de multiples applications, par exemple pour des analyses biologiques et du criblage de composés susceptibles de se lier aux polymères immobilisés.

De manière générale, l'analyse des puces et "arrays" peut être réalisée selon diverses techniques bien connues de l'homme du métier (par exemple fluorescence, radioactivité, spectrométrie de masse, résonance plasmonique de surface, infra-rouge, chimiluminescence).

Lorsque le polymère biologique est un acide nucléique, les produits de l'invention constituent des outils performants pour l'analyse en parallèle d'un grand nombre de gènes ou de séquences d'ADN ou d'ARN. Leur principe de fonctionnement repose sur la propriété d'hybridation ou d'appariement de deux brins de séquences complémentaires afin de reconstituer la double hélice d'ADN. Selon un mode de réalisation particulier, des sondes d'oligonucléotides de séquence connue, immobilisées sur un substrat support, sont mises en présence de cibles extraites d'un échantillon biologique à analyser, et marquées à l'aide de marqueurs fluorescents.

Selon un mode de réalisation particulier, pour savoir où il y a eu hybridation, la puce est ensuite lue sur un microscope confocal, puis analysée en quantifiant l'intensité de fluorescence sur les différents spots, chacun d'eux correspondant à une séquence donnée.

Les produits de l'invention sont particulièrement adaptés pour étudier des profils d'expression d'ARNm, séquences des acides nucléiques, ou rechercher des polymorphismes ou des mutations dans de l'ADN génomique, par exemple.

5 De manière générale, les produits de l'invention constituent des outils diagnostiques simples et pratiques d'utilisation, pour la détection de maladies infectieuses ou génétiques notamment.

10 Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### **LEGENDE DES FIGURES :**

15 La figure 1 représente un schéma de principe de formation de films Langmuir-Blodgett (LB) à partir d'acides phosphoniques à chaîne longue. Le dépôt du film LB a lieu sur les deux faces de la lame de verre.

20 La figure 2 représente un schéma d'ancrage d'un oligonucléotide sur une plaque portant une couche de phosphonate de zirconium, et l'utilisation du produit obtenu par un test d'hybridation.

#### **EXEMPLES**

##### **Exemple 1 : Immobilisation d'oligonucléotides**

25

##### *1.1 Obtention du support*

On utilise des lames de verre revêtues d'un film LB à base de phosphonate de zirconium, comme illustré à la figure 1 et comme décrit dans Benítez et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124:4363-4370.

30

Les lames de verre sont ensuite stockées dans de l'eau ultrapure (résistivité voisine de 18 M $\Omega$ /cm). Avant utilisation, celles-ci

sont séchées par centrifugation avant d'être spottées à l'aide d'un robot. Les deux côtés de la lame peuvent être utilisés indifféremment.

### 1.2 Essai préliminaire :

5 Une première étude de faisabilité a montré qu'un oligonucléotide de 35 bases, phosphorylé en position 3' et marqué en position 5' par une sonde fluorescente CY3, s'ancre spontanément par simple "spotting" sur les films de Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de zirconium. Il apparaît que c'est bien le phosphate  
10 terminal qui est responsable de l'ancrage sur le film, car pour un oligonucléotide identique non phosphorylé en 3', dans les mêmes conditions de "spotting", la quantité de sondes fixée est très inférieure (d'un facteur 5). Cette fixation "non spécifique" est probablement provoquée par une interaction du zirconium avec les groupements  
15 phosphodiester joignant les unités nucléotidiques. De plus, la fixation est stable dans les conditions standard de lavage des puces à ADN. On constate donc un bon accrochage de l'oligonucléotide phosphorylé par rapport à l'homologue non phosphorylé.

### 20 1.3 Oligonucléotides employés :

Dans cet essai, on a immobilisé quatre types d'oligonucléotides, à savoir :

- un oligonucléotide 35 mer (baptisé 1) ;
- son analogue phosphorylé en position 5' (baptisé 2 = 1-5'-  
25  $\text{OPO}_3\text{H}_2$ ) ;
- l'analogue de 2 comportant un groupe espaceur de 11 motifs adénine, entre l'oligonucléotide et le groupement phosphate terminal (baptisé 3 = 1-(A)<sub>11</sub>-5'- $\text{OPO}_3\text{H}_2$ ) ; et
- l'analogue de 3 non phosphorylé (baptisé 4 = 1-(A)<sub>11</sub>)

30

### 1.4 Immobilisation des oligonucléotides :

Les oligonucléotides en solution dans du SSC 1X (pH ajusté à 6 par ajout d'HCl) ont été "spottés" sur ces lames, à des concentrations de 50  $\mu$ M, 20  $\mu$ M et 5  $\mu$ M.

Après "spotting", on laisse sécher les lames à l'air libre et on les  
 5 laisse pendant 24 heures dans une boîte fermée. Les lames sont ensuite rincées pendant 2 minutes dans 4 bains successifs : SSC 2X + 0,1 % SDS, SSC 1X, puis deux fois SSC 0,2X. Après séchage par centrifugation, les lames sont prêtes pour hybridation.

10

### **Exemple 2 : Test d'hybridation utilisant la puce à ADN**

Des tests d'hybridation ont été effectués avec la lame de verre préparée conformément à l'exemple 1, sur laquelle les quatre types d'oligonucléotides sont immobilisés.

15 Pour cela, on a déposé sous lamelle 20  $\mu$ l d'une solution de l'oligonucléotide 35 mer complémentaire, marqué en position 5' par un motif CY3. La concentration en oligonucléotide complémentaire choisie a une valeur correspondant à 0,002 unité DO/ $\mu$ l (soit dans ce cas environ 5  $\mu$ M), le solvant utilisé étant un mélange d'hybridation  
 20 classique contenant du formamide, du tampon Tris EDTA pH8 [tris = tris(hydroxyméthyl)aminométhane], du SDS 10% [SDS = dodécylsulfonate de sodium] et du tampon SSC 20 X [NaCl 3M et citrate de sodium 0,3M]. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant une nuit dans des chambres d'hybridation du type « Arrayit ». A l'issue de  
 25 l'hybridation, les lames ont subi un lavage pendant 2 minutes dans 4 bains successifs : SSC 2X + 0,1 % SDS, SSC 1X, puis deux fois SSC 0,2X. Après séchage par centrifugation, la saisie des images rendant compte de la fluorescence des différents spots (tâches) a été analysée sur un scanner. L'analyse de ces images a permis de quantifier  
 30 l'intensité de fluorescence des différents spots. La même procédure a été effectuée en utilisant pour l'hybridation un oligonucléotide 35 mer

non complémentaire, marqué également en position 5' par un motif CY3.

Lorsque l'oligonucléotide non complémentaire est utilisé, aucune fluorescence n'est détectée. Lorsque l'oligonucléotide complémentaire est utilisé, un signal de fluorescence est observé sur tous les spots, avec les caractéristiques suivantes :

- 1- Bruit de fond autour des spots faible (fond noir).
- 2- L'intensité de fluorescence des spots correspondant à 1 et 4 est 6 fois plus faible que pour leur homologue phosphorylé en 5',  
10 pour une même concentration de dépôt. Cela montre l'effet favorable très net de la présence du groupe phosphate pour l'accrochage de l'oligonucléotide sur le support.
- 3- L'intensité de fluorescence des spots correspondant à 3 est 1,6 fois plus forte [puissance laser 80%, puissance  
15 photomultiplicateur 70% : intensité 48000] que pour l'oligonucléotide 2, pour une même concentration de dépôt. Cela montre l'effet favorable très net de la présence d'un groupe espaceur (11 motifs adénine) entre l'oligonucléotide et le groupe phosphate, permettant d'éloigner l'oligonucléotide de la surface du support, et facilitant ainsi l'hybridation.
- 20 4- Pour les oligonucléotides 2 et 3, les intensités de fluorescence pour des concentrations de dépôt respectivement de 50, 20 et 5  $\mu\text{M}$  est de 2/2/1, ce qui montre que la concentration de dépôt optimale se situe entre 20 et 5  $\mu\text{M}$ .



### REVENDICATIONS

- 5        1. Produit de type puce biologique, comprenant un support solide plan présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre étant immobilisé sur
- 10        ladite surface par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.
- 15        2. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un acide nucléique phosphorylé en position 5'.
3. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un acide nucléique phosphorylé en position 3'.
- 20        4. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est une protéine phosphorylée.
- 25        5. Produit selon la revendication 1, dans lequel le polymère biologique est un oligo ou polysaccharide phosphorylé ou modifié par un groupement phosphonate.
6. Produit selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le métal est lié à la surface du support par l'intermédiaire d'une molécule espaceur.
- 30        7. Produit selon la revendication 6, dans lequel la molécule espaceur comprend une chaîne d'acide gras portant un

groupement phosphonate, auquel se lie le métal par liaison iono-covalente.

5 8. Produit selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le métal est le zirconium.

9. Produit selon la revendication 7, dans lequel la molécule espaceur est l'acide octadécylphosphonique et le métal est le zirconium.

10

10. Produit selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le support est du verre.

15 11. Produit selon la revendication 1, comprenant une lame de verre présentant une surface recouverte d'une monocouche d'octadécylphosphonate de zirconium, au moins un acide nucléique portant un groupement phosphate en 5' étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre ledit groupement phosphate de l'acide nucléique et le zirconium.

20

12. Méthode de fabrication d'un produit de type puce biologique, tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11, comprenant l'immobilisation d'au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate libre sur un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate, ledit polymère biologique étant immobilisé sur ladite surface par liaison iono-covalente entre le groupement phosphate ou phosphonate libre dudit polymère et le métal.

25  
30

13. Méthode selon la revendication 12, comprenant en outre une étape d'obtention du polymère biologique portant un groupement phosphate.
- 5 14. Méthode selon la revendication 13, dans laquelle le polymère est un acide nucléique phosphorylé en 5' par voie enzymatique.
- 10 15. Kit de préparation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, comprenant les éléments suivants :
- un support solide présentant une surface recouverte d'un métal capable de liaison de coordination avec un groupement phosphate ou phosphonate ;
  - au moins un polymère biologique portant un groupement phosphate ou phosphonate ;
  - 15 - éventuellement des réactifs.
- 20 16. Utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, à des fins de criblage de composés susceptibles de se lier audit polymère biologique immobilisé.
- 25 17. Utilisation d'un produit de type puce biologique tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, comme outil de diagnostic *in vitro*.

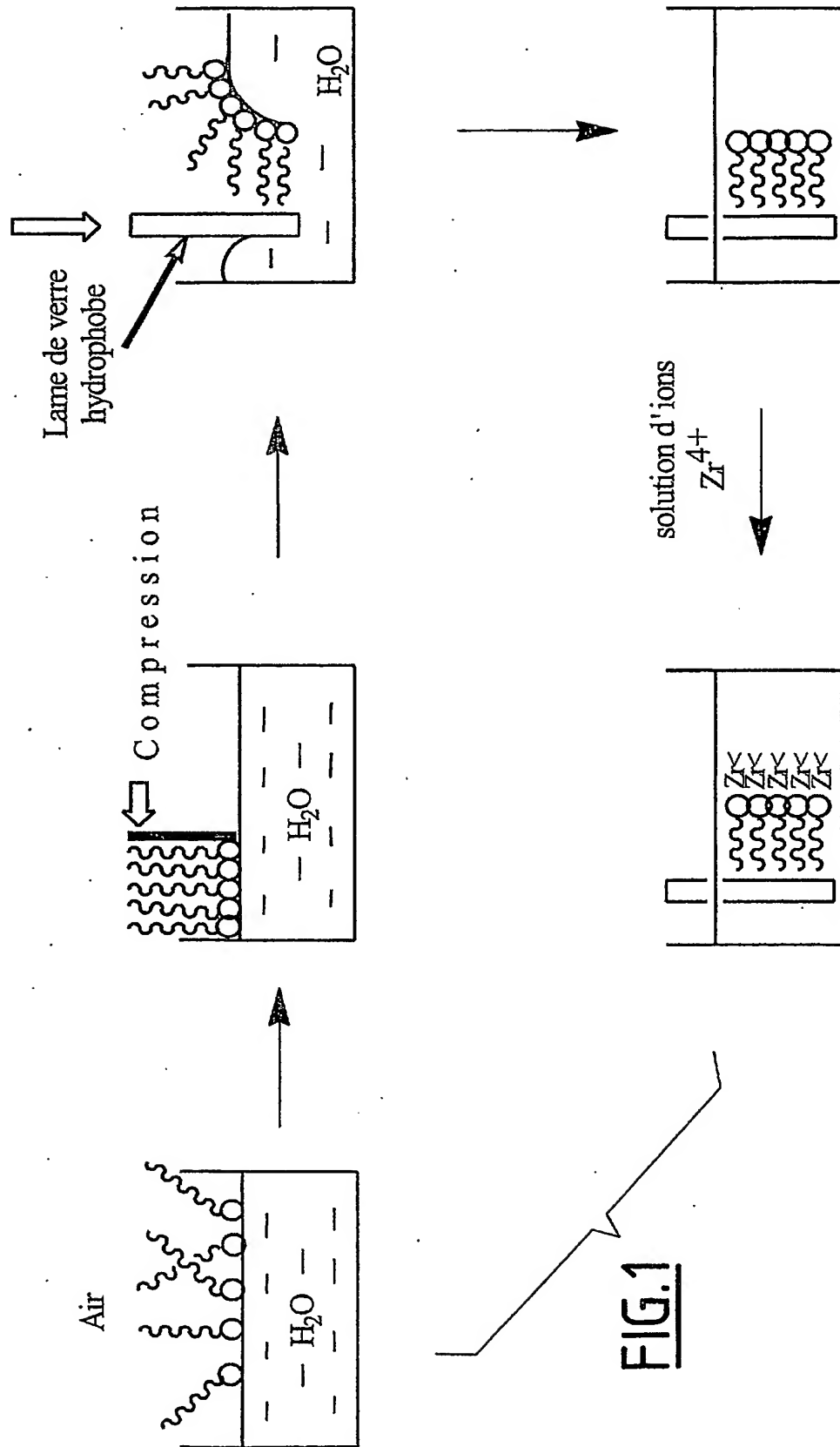


FIG.1

2/2

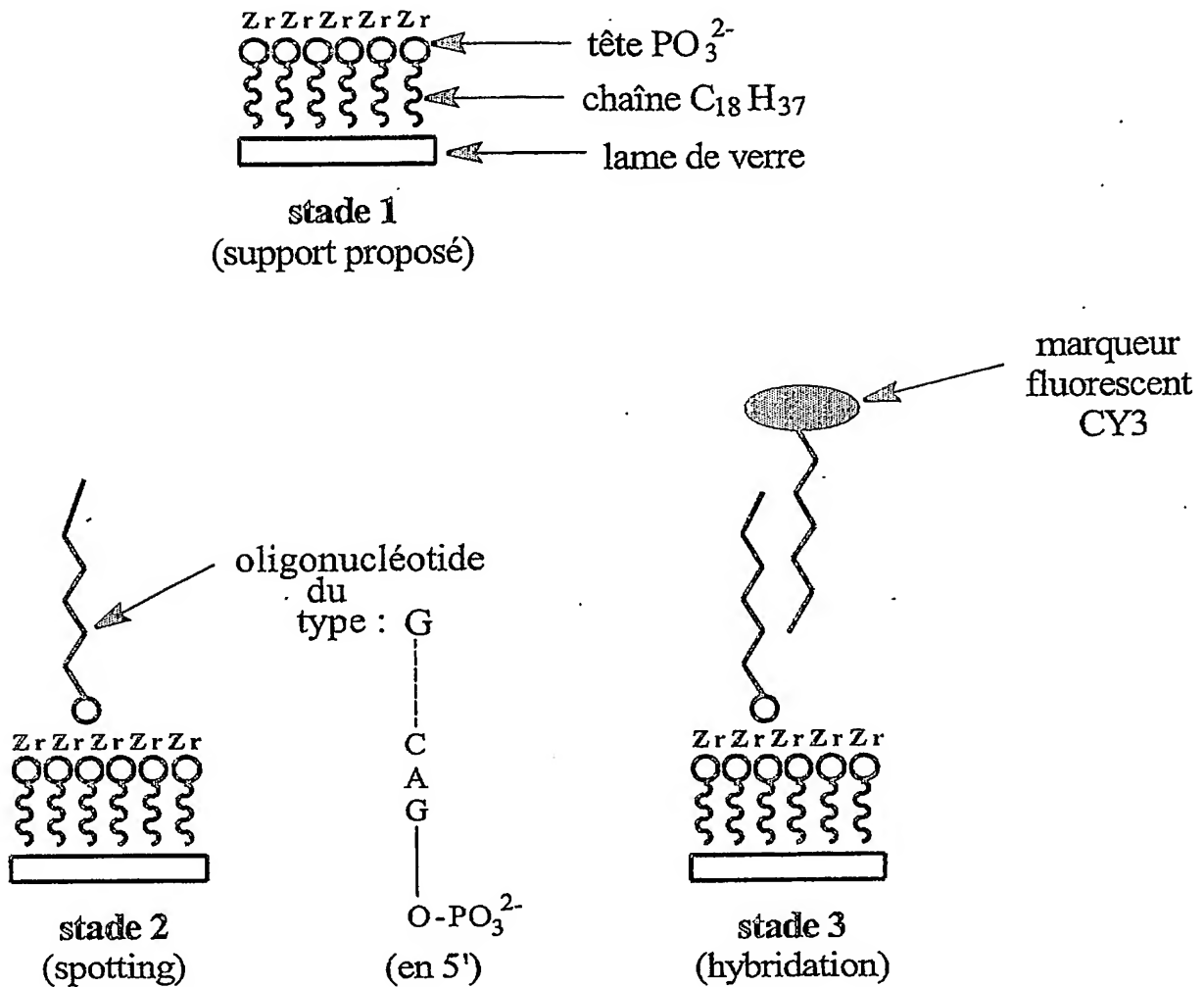


FIG.2

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54


**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1 / 2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BFF 02/0290	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02 09456	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>			
Procédé de fabrication de puces biologiques			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>			
<b>1</b> Nom		TELLIER	
Prénoms		Charles	
Adresse	Rue	3, rue du plongeon	
	Code postal et ville	44130 NOTRE DAME DES LANDES FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>2</b> Nom		PIPELIER	
Prénoms		Muriel	
Adresse	Rue	4, rue Marconi	
	Code postal et ville	44000 NANTES FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>3</b> Nom		DUBREUIL	
Prénoms		Didier	
Adresse	Rue	7, La Boulaye	
	Code postal et ville	44710 PORT SAINT PERE FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		Paris, le 26 septembre 2002	
		C. JACOBSON n° 92.1119	
			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2 / 2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 206

Vos références pour ce dossier ( <i>facultatif</i> )	BFF 02/0290
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 09456

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de fabrication de puces biologiques

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

<b>1</b> Nom		BUJOLI
Prénoms		Bruno
Adresse	Rue	La Basse Bodinière
	Code postal et ville	44240 SUCE SUR ERDRE FRANCE
Société d'appartenance ( <i>facultatif</i> )		
<b>2</b> Nom		TALHAM
Prénoms		Daniel
Adresse	Rue	1040 NE 5th Terr.
	Code postal et ville	Gainesville, FL 32601 U.S.A.
Société d'appartenance ( <i>facultatif</i> )		
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance ( <i>facultatif</i> )		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**

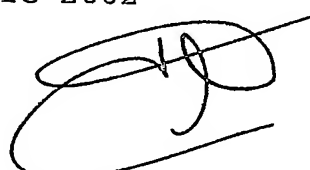
**DU (DES) DEMANDEUR(S)**

**OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 26 septembre 2002

C. JACOBSON  
n° 92.1119



PCT Application

**FR0302318**





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**